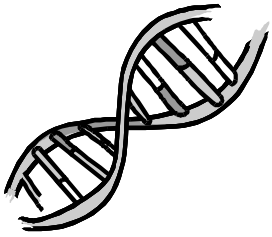
MutaPLATE®
Enterovirus
real time RT-PCR Kit



Screening Test für den Nachweis humaner Enterovirus RNA (Polio-, Coxsackie A-, Coxsackie B- und Echoviren) in klinischen Proben mittels offenen (z. B. Mikrotiterplattenformat) *real time* PCR - Systemen (z. B. von Applied Biosystems, Stratagene, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler, etc.) sowie im LightCycler 480 (Roche).

REF KG1900232 Σ 32

REF KG1900296 Σ 96

-20°C

Nur für in vitro Diagnostik

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com Fax: +49 (0)6251/ 849430

CE

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **MutaPLATE® Enterovirus** *real time* RT-PCR Kit ist ein qualitativer Screening-Test zum Nachweis von *Enterovirus* RNA (Polio-, Coxsackie A-, Coxsackie B- und Echoviren) in klinischen Proben (Stuhl, Vollblut, Plasma, Respirationstraktproben, CSF (cerebrospinal fluid) und anderen Körperflüssigkeiten) mittels offenen (z. B. Mikrotiterplattenformat) *real time* PCR - Systemen (z. B. von Applied Biosystems, Stratagene, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler, etc.) sowie im LightCycler 480 (Roche).

2. EINLEITUNG

Humane Enteroviren sind ubiquitär vorkommende, hochinfektiöse Krankheitserreger, die zur Familie der Picornaviridae gehören. Die mit hoher Inzidenz (weltweit ca. 500 Millionen Infektionen/ Jahr) vorkommenden Pathogene sind kleine unbehüllte RNA-Viren, die sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen sind. So behalten Enteroviren selbst bei pH-Werten 3 – 9 sowie in Anwesenheit von Detergenzien ihre Infektiosität. Bislang sind ca. 70 verschiedene Serotypen beschrieben aber kein effektives antivirales Chemotherapeutikum zur Bekämpfung der Viren ist verfügbar. Die Übertragung der Viren erfolgt von Mensch zu Mensch fäkal-oral , d.h. ausschließlich über Kontakt- und Schmierinfektion. Kontaminierte Lebensmittel/ Trinkwasser stellen dabei eine wichtige Infektionsquelle dar. Das Virus kann noch über Wochen nach der akuten Erkrankung mit dem Stuhl ausgeschieden werden.
Enterovirusinfektionen können das ganze Jahr über auftreten und lebensbedrohende Infektionen hervorrufen (insbesondere bei Kindern). Im Sommer kommt es in Deutschland zu Häufungen der Infektionen aufgrund kontaminierter Badegewässer (Schwimmbad, See). Enteroviren lösen zahlreiche Krankheitsbilder aus, z. B. Infektionen des oberen Respirationstrakts, „Sommergrippe“, Herpangina, Hand-Fuß-Mund-Krankheit, jugendlicher Diabetes mellitus, Infektionen des Gastrointestinaltrakts, Augeninfektionen, oder epidemische Myalgie. Aber auch Myocarditis, Paralysis, multiples Organversagen, Meningitis und Encephalitis sind häufig mit einer Enterovirusinfektionen assoziiert.

3. TESTPRINZIP

MutaPLATE® Enterovirus *real time* RT-PCR enthält spezifische Primer, Hydrolysis-Sonden und weitere Reagenzien zur Detektion von Enterovirus RNA in offenen real time PCR-Systemen. Stuhlproben oder andere klinische Proben, wie z.B. Vollblut, Plasma, Respirationstrakt-Proben, CSF (cerebrospinal fluid), etc. können als Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion und den nachfolgenden Erregernachweis eingesetzt werden. Zielsequenz zur Detektion ist innerhalb der 5`-untranslatierten Region (**5`-UTR**) des Enterovirus-Genoms.

Während der PCR wird die Spezifität des entstandenen Amplikons durch *real time* Hybridisierung und anschließende Hydrolyse von **Enterovirus**-spezifischen Sonden (mit Fluorophor- und Quencher- Molekül markierte Oligonukleotide) überprüft. Bei spezifischer Enterovirus-Amplifikation wird ein Fluoreszenssignal emmittiert, welches von der optischen Einheit des *real time* PCR (Mikrotiterplatten-)Systems (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-, Corbett Research: Rotor Gene 3000/ 6000- Software) detektiert wird: **Enterovirus-spezifische Amplifikation** wird dabei mittels **FAM**-Fluoreszenz (**470**/ **510 nm**) gemessen.

Zudem überprüft eine in jede Reaktion eingeschlossene **interne Kontrolle**, welche parallel zu den Erregersequenzen koamplifiziert und detektiert wird, eine mögliche RT- bzw. PCR-Inhibition: Die Detektion dieser amplifizierten internen Kontrolle wird mittels **VIC** (bzw. **HEX/ JOE)** - Fluoreszenz (**530**/ **555 nm**) gemessen.

4. KITBESTANDTEILE

Jedes Testkit enthält Reagenzien zur Durchführung von **32** bzw. **96** Bestimmungen, sowie eine Gebrauchsanleitung.

Bezeichnung	Reagenz	Konfektion 32	Konfektion 96	Deckelfarbe
A1	Enzym Mix	1x 26 µl	3x 26 µl	**blau**
A2	Primer-/ Sonden Mix	1 x 460 µl	3 x 460 µl	**gelb**
A3	Positivkontrolle	1 x 50 µl	2 x 50 µl	**rot**
A4	Negativkontrolle	1 x 50 µl	1 x 50 µl	**grün**

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Benötigte Materialien - mitgeliefert:

- Reagenzien für die *real time* RT-PCR in offenen Systemen (z.B. Mikrotiterplatten)
- Gebrauchsanweisung

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- *real time* PCR-System, z. B. Applied Biosystems, Stratagene, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler oder Roche: LightCycler 480, etc..
- PCR-Reaktionsgefäße (oder optische Mikrotiterplatten mit transparenten optischen Abdeckfolien).
- Tischzentrifuge (13000 rpm) und Kühlbehälter für PCR-Gefäße.
- RNA-Extraktionskit für Stuhlproben (z. B. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035, **Immundiagnostik**).
- Pipetten (0,5 – 1000 µl) mit sterilen Filterspitzen.
- sterile Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml).

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 bis A4) sollten ***bis zum unmittelbaren Gebrauch*** **bei <-20°C** gelagert werden.
- Ein **mehrfaches Auftauen/ Einfrieren** der Reagenzien A1, A2, und A3 ist **unbedingt** zu **vermeiden** (**bei Bedarf** nach dem erstmaligem Auftauen **geeignete Aliquots** herstellen und die Reagenzien dann **sofort** wieder einfrieren).
- Während der PCR-Vorbereitung alle Arbeitsschritte *zügig* in einem Kryobehälter durchführen bzw. alle Reagenzien stets **geeignet kühlen**.
- Primer-/ Sonden-Mix (A2) vor **Lichtkontakt schützen**.
- Alle Reagenzien können bis zum Ablauf des (auf der Kit-Packung angegebenen) Mindesthaltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Dieser Test muss durch speziell in Molekularbiologie-Techniken geschultes Personal durchgeführt werden.
- Die klinischen Proben müssen als potentiell infektiöses Material angesehen und entsprechend auch entsorgt werden.
- Die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) müssen eingehalten werden.
- Testkit nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden.

AMPLIFIKATION: Die PCR-Technologie ist sehr sensitiv, d. h. die Vermehrung eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Diese Kopien können in Form von Aerosolen entweichen und sich auf Unterlagen in der Umgebung festsetzen. Um eine Kontamination von Proben mit Amplifikaten aus vorausgegangenen Experimenten zu vermeiden, sollte in drei (möglichst auch räumlich) von einander getrennten Bereichen gearbeitet werden und zwar:

1) Bereich, in dem die Proben vorbereitet werden.
2) Bereich, in dem der Master-Mix angesetzt wird.
3) Bereich, in dem der Master-Mix und die Proben-RNA in die PCR-Gefäße pipettiert werden.

Pipetten, Reaktionsgefäße und andere Arbeitsmittel sollten nicht innerhalb dieser drei verschiedenen Arbeitsbereiche zirkulieren.

- Sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzen. Aerosolbildung vermeiden.
- Für jeden Arbeitsplatz neue Handschuhe benutzen und Kittel tragen.
- Regelmäßig Pipetten und Laborbänke dekontaminieren (keine ethanolhaltigen Lösungen benutzen).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die gesamte Durchführung ist in folgende drei Schritte aufgeteilt:

A) RNA-Extraktion (aus Stuhlproben).
B) Reverse Transkription der RNA und nachfolgende Amplifikation/ kombinierte Detektion der entstandenen cDNA-Templates mittels der Hybridisierungssonden.
C) Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Software des verwendeten *real time* PCR-Kapillarsystems.

A) PROBENVORBEREITUNG

1) Die **Extraktion viraler RNA** wird mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungs-Kits (z. B. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035 von Immundiagnostik) aus Stuhlproben bzw. anderen klinischen Proben (Vollblut, Plasma, Respirationstraktproben, CSF [cerebrospinal fluid] etc.) durchgeführt und erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu bei:

a) **Stuhlproben**: eine „erbsengroße“ Stuhlmenge in ca. 1,5 ml sterilem (Reinst-)wasser (keine Puffer verwenden) aufschwemmen, gut vortexen und nach Absinken der festen Bestandteile (gegebenenfalls 2 min bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren) den Überstand als Ausgangsmaterial verwenden. Sehr flüssige Stuhlproben können auch direkt, also ohne vorherige Aufschwemmung, zur Extraktion eingesetzt werden (aber auch hier gut vortexen und nach ggf. notwendigem zentrifugieren (2 min 5000 rpm) den Überstand unverdünnt verwenden.

b) **Liquor**: Liquorproben werden unmittelbar (nativ) in die Extraktion eingesetzt.

c) **Abstrichtupfer** (Bläscheninhalt):
Abstrichtupfer zunächst in **500 µl sterilem (Reinst-)Wasser** einweichen lassen, dann gut vortexen. Anschließend den Tupfer entnehmen und die verbleibende Flüssigkeit zur Extraktion einsetzen.

2) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, **müssen** die Proben bei **< -20°C** aufbewahrt werden.

B) *REAL TIME* Enterovirus (MutaPLATE) RT-PCR PROTOKOLL

Es ist ratsam, das gesamte Protokoll zu lesen, bevor mit der Durchführung begonnen wird. Der Ansatz einer Gesamtmenge an Master-Mix für die jeweilige Anzahl an Proben und die entsprechenden Kontrollen sollte folgendermaßen erfolgen:

1) Die Enzym-Mix Menge für eine Reaktion mit der Anzahl (N) der durchzuführenden Reaktionen (inklusive Kontrollen A3 und A4) multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlichen (virtuellen) Ansatz berechnen. Mit allen weiteren Reagenzien in der gleichen Weise verfahren.
Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen!

Reaktionsvolumen	Master-Mix Volumen
0,8 µl Enzym-Mix (A1)	0,8 µl x (n +1)
14,2 µl Primer- und Sonden-Mix (A2)	14,2 µl x (n +1)

2) Die folgenden Reagenzien in einem sterilen Reaktionsgefäß durch **mehrmaliges Auf- und Abpipettieren** (**ca. 15 – 20 x**) **gut mischen** (**NICHT VORTEXEN !**): Enzym-Mix (A1) und Primer-/ Sonden-Mix (A2). Diese Mischung stellt den Master-Mix dar; kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren.

3) **15 µl** des Master-Mix mit einer Mikropipette und sterilen Filterspitzen in jede der LightCycler® Kapillaren pipettieren. **5 µl** der Proben-RNA bzw. Positiv- und Negativ-Kontrollen (A3 und A4) zu den jeweiligen Kapillaren zupipettieren (es empfiehlt sich zuerst die Negativkontrolle zu pipettieren und diese erst am Schluss zu verschließen, um Kontaminationen zu überprüfen). Die Kapillaren jeweils unverzüglich verschließen, um Kontaminationen zu vermeiden und dann in einer LightCycler® Kapillar-Zentrifuge kurz abzentrifugieren.

4) Folgendes LightCycler® RT-PCR Protokoll durchführen:

50°C	für	**10 min**	*reverse Transkription*
95°C	für	**10 min**	*initiale Denaturierung*
95°C	für	**15 sec**	**45 Zyklen**
53°C	für	**30 sec**	ramping time: 20°C/sec – aqu. mode here: SINGLE
72°C	für	**15 sec**	
4°C	für	**10 sec**	*Abkühlung* (ev. gerätebedingt Raumtemperatur)

C) RT-PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1) Durchführung der real time RT-PCR im entsprechenden offenen System.

2) **Enterovirus spezifische Amplifikation** wird mittels **FAM** – Fluoreszenz (bei Source **470**/ Detector **510 nm**) detektiert. Die i**nterne Kontrolle** wird mittels **VIC** (bzw. HEX/ JOE) - Fluoreszenz (bei Source **530**/ Detector **555 nm**) gemessen.

   Folgende Einstellung sollten für die Bestimmung von Reporter-/ Quencher-Molekülen mit der ABI PRISM SDS-Software (bzw. der vergleichbarer Instrumente) gewählt werden:

Detection	Reporter	Quencher
Enterovirus RNA: 510 nm	**FAM**	**None**
Interne Kontrolle: 555 nm	**VIC** (HEX / JOE)	**None**

3) Folgende Resultate sind möglich:

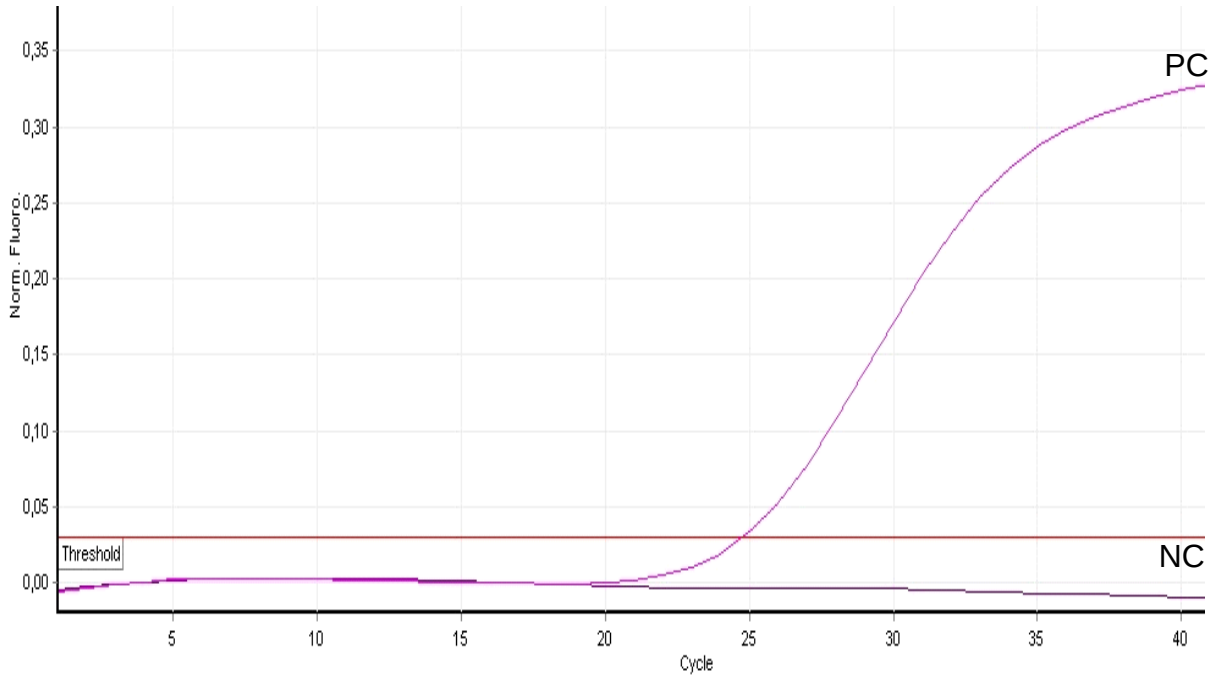
   1) Es wird **FAM**-Fluoreszenz wird detektiert.
      Das Ergebnis ist positiv: **die Probe enthält *Enterovirus* - RNA.**

      In diesem Fall ist die Detektion der VIC (bzw. HEX / JOE) - Fluoreszenz nicht notwendig, da hohe *Enterovirus* cDNA- Konzentrationen zu einem verminderten/ fehlenden Fluoreszenz-Signal der internen Kontrolle führen kann (Kompetition).

   2) Es wird **keine FAM**-Fluoreszenz detektiert, jedoch eine **VIC** (bzw. HEX / JOE) - Fluoreszenz (Signal der internen Kontrolle).
      Das Ergebnis ist negativ: **Die Probe enthält keine *Enterovirus* - RNA.**

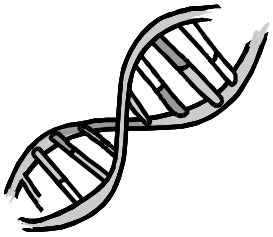
      Das detektierte Signal der internen Kontrolle schließt die Möglichkeit einer RT-PCR-Inhibition aus.

   3) **Weder FAM**-, **noch VIC** (bzw. HEX / JOE) - Fluoreszenz wird detektiert.
      Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.
      Die PCR-Reaktion wurde **inhibiert**.



MutaPLATE® Enterovirus

real time RT-PCR Kit



Version 2011

For detection of Enterovirus-RNA (Polio-, Coxsackie A-, Coxsackie B- and Echovirus) in clinical samples using open *real time* PCR systems (e. g. Applied Biosystems ABI, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: Smart Cycler, Stratagene: Mx3500, Amplifa: ECO, sowie Roche: Light Cycler 480).

REF KG1900232 Σ 32

REF KG1900296 Σ 96

-20°C

For *in vitro* diagnostic use only

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com Fax: +49 (0)6251/ 849430

CE

1. INTENDED USE

The **MutaPLATE® Enterovirus** *real time* RT-PCR kit is an assay for the specific detection of Enterovirus-RNA (Polio-, Coxsackie A-, Coxsackie B- and Echoviruses) in stool samples, respiratory samples, liquor or vesicle fluid using open *real time* RT-PCR systems (e. g. from ABI, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: Smart Cycler, Stratagene: Mx3500, Amplifa: ECO, sowie Roche: Light Cycler 480).

2. INTRODUCTION

Enteroviruses are highly contagious pathogens belonging to the family of Picornaviridae. They are small, non-enveloped ssRNA-viruses which are very resistant to environmental conditions. Even at pH 3-9 or in the presence of detergence Enteroviruses remain infectious. Thus far, there are no effective antiviral chemotherapeutics available. Until now about 70 serotypes are known. The transmission from person to person mainly is fecal-orally. Contaminated foods and drinking water are important sources of infection. The viruses can be egested in stool even weeks after an acute infection.
Infections with Enteroviruses can occur throughout the year, however, in summer, contaminated water in swimming pools or lakes lead to an increased number of Enterovirus infections.
The symptoms caused by Enteroviruses are numerous: infections of the upper respiratory tract, undifferentiated fever, herpangina, hand-foot-mouth-disease, rash disease, paralyses, etc..

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **MutaPLATE® Enterovirus** contains specific primers and fluorescence-labelled hydrolysis probes for the detection of Enterovirus-RNA in clinical samples. Human stool samples or other clinical samples, such as whole blood, plasma, respiratory samples, CSF (cerebrospinal fluid) etc. can be used as starting material for RNA-extraction and subsequent pathogen analysis with **MutaPLATE® Enterovirus** *real time* RT-PCR Kit.

The **reverse transcription (RT)** of potentially present viral RNA to cDNA and the subsequent amplification of Enterovirus-specifc fragments are performed in a **one step RT-PCR**. The target sequence for the detection is located in the 5`-untranslated region (5`-UTR) of the viral genome.

Detection of Enterovirus amplificates is achieved in *real time* by hybridization and subsequent hydrolysis of Enterovirus-specific fluorescence probes. Their emitted signal is measured (during the PCR process) by the optical unit of the *real time* PCR system in use (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-, Corbett Research: RotorGene 3000/ 6000-, Cepheid: SmartCycler-, Roche: LC480-software). **Enterovirus-specific amplification** is measured in the **FAM**- channel (**470**/ **510** nm).

Furthermore, **MutaPLATE® Enterovirus** *real time* RT-PCR Kit contains also a separate RNA Internal Control (IC) which is detected in a second independent amplification system. This IC allows the detection of a potential inhibition of the reverse transcription or the PCR. By doing so, the risk for false-negative results is minimized extensively. The fluorescence of the **RNA internal control** is measured in the **VIC/ HEX/ JOE/ TET**- channel (**530**/ **555** nm).

4. KIT CONTENT

Each kit contains enough reagents to perform **32** or **96** tests (the vials contain the indicated amounts and a further surplus) and also a package insert. Please check provided manual always for current date and use it together with the reagents in the kit

	Reagent	Confection 32	Confection 96	Colour
A1	Enzyme Mix	1 x **26** µl	3 x **26** µl	**blue**
A2	Primer-/ Probe Mix/ IC	1 x **460** µl	3 x **460** µl	**yellow**
A3	Positive Control	1 x **50** µl	2 x **50** µl	**red**
A4	Negative Control	1 x **50** µl	2 x **50** µl	**green**

5. TEST PERFORMANCE

Required materials - provided:

- Reagents for *real time* RT-PCR
- Package insert

Required materials - not provided:

- *Real time* PCR instrument (e. g. from ABI, Stratagene: Mx3500, Corbett Research: Rotor Gene, Cepheid: Smart Cycler, Amplifa: ECO or Roche: Light Cycler 480)
- PCR reaction tubes (or optical microtiter plates with transparent optical covers)
- Table centrifuge (13000 rpm), Vortexer and Cryo-container for PCR tubes
- RNA extraction kit for stool samples (e. g. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA),** KG1035, from **Immundiagnostik**)
- Pipettes (0.5 µl – 200 µl) with sterile filter tips
- sterile reaction tubes (1,5 ml and 2,0 ml)

6. STORAGE AND HANDLING

The **MutaPLATE® Enterovirus** *real time* RT-PCR Kit is shipped on dry ice. All components must be stored at -20°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package. After initial usage, reagents are stable for up to six months. The reagents should not be thawed and frozen more than 2 times. If necessary, the Primer-Probe-Mix and the Positive Control have to be aliquoted.

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- This assay needs to be carried out by in Molecular Biology methods skilled personnel
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and all equipment used has to be treated as potentially contaminated
- This assay needs to be run according to GLP (Good Laboratory Practice)
- Stick to the protocol described below
- Do not use the kit after its expiration date
- The Enzyme-Mix is liquid even at -18°C. Take it out of the freezer shortly before usage and put it back immediately
- Don`t combine **MutaPLATE® Enterovirus** kit components with different lot numbers.

AMPLIFICATION: The PCR technology is utmost sensitive. Thus, amplification of a single molecule generates millions of identical copies. These copies may evade through aerosols and sit on surfaces. In order to avoid contamination of samples with RNA which previously was amplified, it is important to physically strictly divide sample and reagent preparation units from sample amplification units. Set up three separate working areas:

1) Area for sample preparation.
2) Area for preparation of Master Mix.
3) Area for pipetting Master Mix and samples to the PCR tubes.

Pipets, vials and other working materials should not circulate among working units!

- Use always sterile pipette tips with filters
- Wear separate coats and gloves in each area
- Avoid aerosols
- Routinely decontaminate your pipettes and laboratory benches with decontaminant (do not use ethanol solutions)

8. PROCEDURE

8.1 SAMPLE PREPARATION

MutaPLATE® Enterovirus *real time* RT-PCR is suitable for the analysis of Enterovirus-RNA that has been extracted from clinical specimens with appropriate isolation methods. Commercially available kits for RNA isolation are recommended (e. g. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, **Immundiagnostik,** KG1035).

Stool Samples:
Suspend stool sample (approx. the size of a pea) in 1.5 ml **sterile water** (do **not** use buffers!) by intensive vortexing and let sediment solid particles (if necessary support by centrifugation for 5 min at 3500g). Use the supernatant for RNA extraction without any further dilution. Very liquid stool samples can be used directly (without further resuspension) for the RNA extraction; to that end, vortex intensively and let sediment solid particles (if necessary support by centrifugation for 5 min at 3500g).

Liquor:
Liquor samples can be used directly ("native") for RNA extraction without prior preparation.

Swab:
Soak the swab in 500 µl **sterile water** (do **not** use buffers!) and resuspend thoroughly by vortexing. Remove the swab and use remaining liquid for RNA extraction.

Important: In addition to the samples always run a „Water Control" in your extraction. Treat this water control analogous to a sample. Comparing the amplification of the Internal Control in the samples to the amplification of the Internal Control in the Water Control will show possible inhibitions of the RT-PCR. Furthermore, possible contaminations during RNA extraction will be detectable.

If the *real time* RT-PCR is not performed immediately, store the extracted RNA at **< -20°C**.

Further information about RNA isolation are to be found in the extraction kit manual or from the extraction kit manufacturer's technical service.

8.2 *Real time* Enterovirus (MutaPLATE®) RT-PCR-PROTOCOL

- Please pay attention to the „ WARNINGS AND PRECAUTIONS “ on page 3
- Before setting up the PCR familiarize yourself with the *real time* PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument
- The programming of the thermal profile should take place before setting up the PCR
- In every PCR run at least one Positive Control and one Negative Control should be included
- Before each use, all reagents - except the Enzyme-Mix - should be thawed completely at room temperature, briefly vortexed, and centrifuged very briefly. Then place all reagents on ice or on a cooling block (+2 to +8°C)

Procedure
The Master-Mix contains all components needed for RT-PCR except for the sample. Prepare a volume of reaction mix with at least one extra (virtual) sample more than required for the total number of RT-PCR assays to be performed due to the reason of imprecise pipetting.

Preparation of the Master-Mix

Number of Reactions	1	N
Primer-/ Probe Mix (A2)	14.2 µl	14.2 µl x (n +1)
Enzyme Mix (A1)	0.8 µl	0.8 µl x (n +1)

Gently mix Primer-Probe Mix and Enzyme Mix in a sterile reaction tube **(!DO NOT VORTEX!).** Briefly centrifuge in a bench top centrifuge.

Put the required number of PCR reaction tubes into the cooling block. Pipet **15 µl** of the Master Mix using micropipets with sterile filter tips into each PCR reaction tube (or well of an optical 96 well microtiter plate); do not forget the controls. Add **5 µl** of the RNA eluates (do not forget the Water Control), the Positive Control (A3) and the Negative Control (A4) to the corresponding PCR reaction tube. It is recommended to close the tubes immediately after filling. We further recommend pipetting the Negative Control first but closing its tube at the very end. This way, contaminations occurring during this pipetting step can be detected. In case optical microtiter plates are used, cover the used wells with an optical adhesive foil.

For the *real time* RT-PCR use following thermal profile.

1. Reverse Transcription	10 min	50 °C
2. Initial Denaturation	10 min	95 °C
3. Amplification of cDNA		
Number of cycles	**45**	
Denaturation	15 sec	95 °C
Annealing	30 sec	53 °C
Extension	15 sec	72 °C
4. Cooling	10 sec	4 °C

8.3 RT-PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

The Enterovirus specific amplification is measured in the **FAM**-channel (source 470 nm/ detection **510 nm**). The amplification of the Internal Control (internal control) is measured in the HEX/ VIC/ JOE / TET-channel (source 530 nm/ detection **555 nm**).

Use following settings to define a reporter + quencher with the ABI PRISM SDS software:

Detection	Reporter	Quencher
Enterovirus RNA	**FAM**	**none**
Internal Control (IC)	**HEX/ VIC/ JOE/ TET**	**none**

Following results can occur:

- A signal in the FAM-channel is detected.
  The result is positive: The sample contains Enterovirus RNA.

  In this case, detection of a signal of the Internal Control in the HEX/ VIC/ JOE/ TET- channel is inessential, as high concentrations of Enterovirus cDNA may reduce or completely inhibit the amplification of the Internal Control.

- No signal in the FAM-channel, but a signal in the HEX/ VIC/ JOE/ TET- channel is detected:
  The result is negative: The sample does not contain Enterovirus RNA.

  The detected signal of the Internal Control excludes the possibility of RT-PCR inhibition.
  If the Ct-value from the Internal Control of the Water Control and the sample differ significantly, a partial inhibition has occurred which may lead to negative results in very weak positive samples (see „Troubleshooting“, page 8).

- Neither in the FAM- nor in the HEX/ VIC/ JOE/ TET- channel a signal is detected:
  A diagnostic statement cannot be made.

  An **inhibition** of the RT-PCR reaction has occurred.

Figure 1 and **Figure 2** show examples for positive and negative *real time* RT-PCR results:

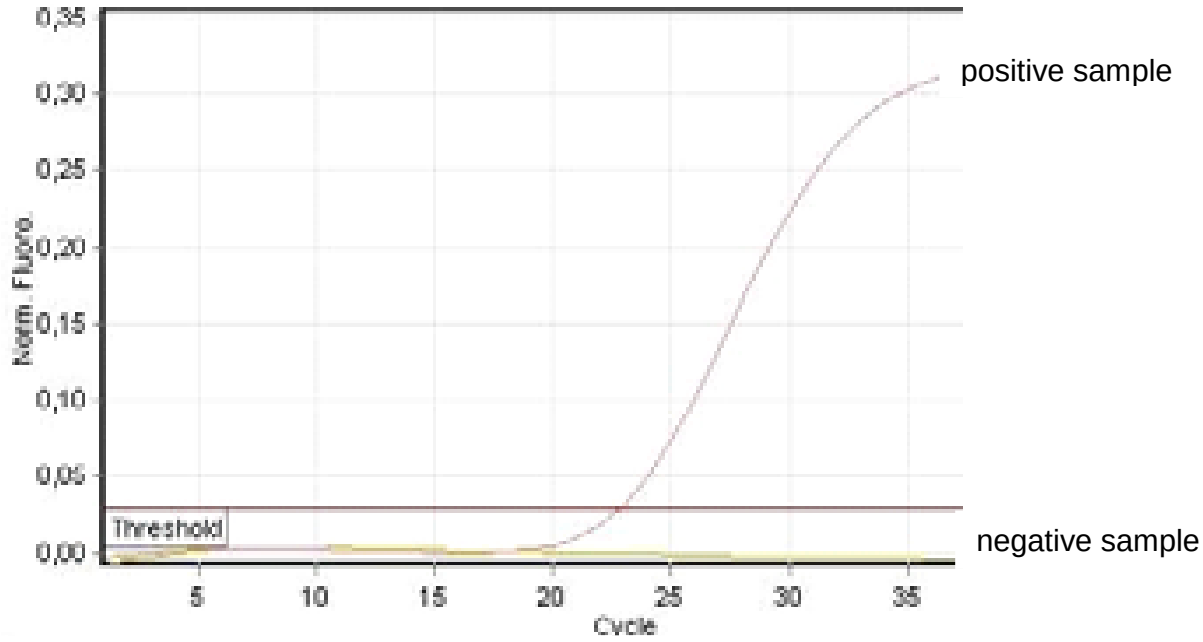


Figure 1:
The positive sample shows Enterovirus-specific amplification in the FAM-channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

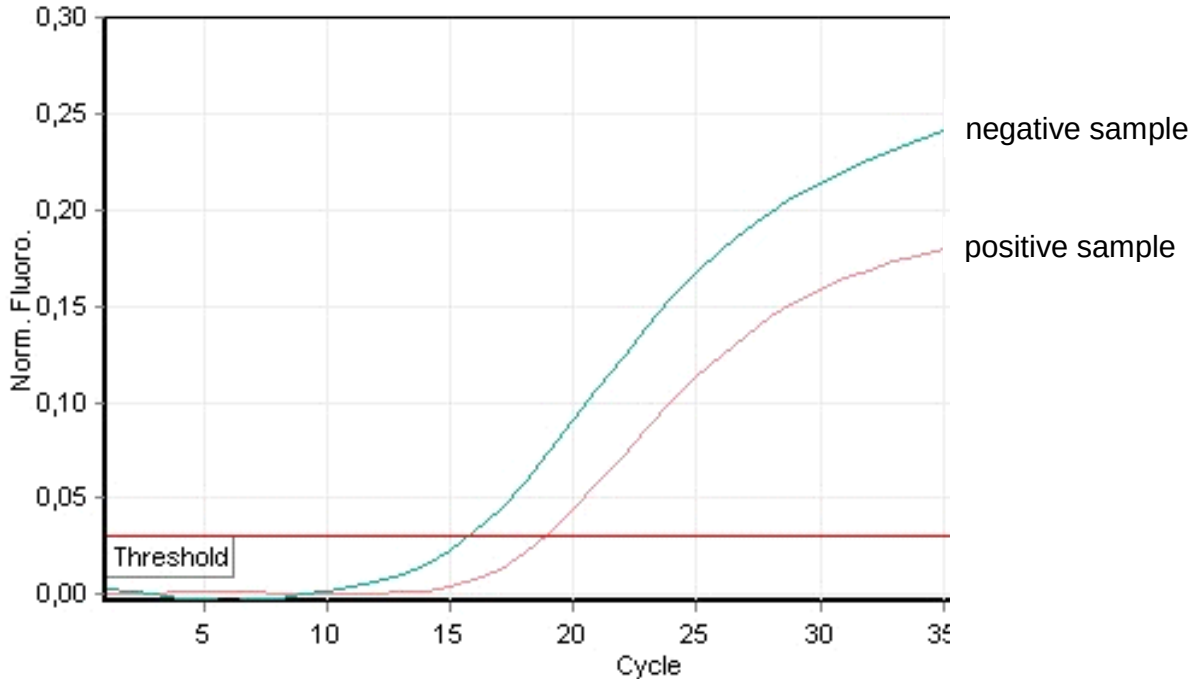


Figure 2:
The positive sample shows a weaker signal in the Internal Control specific HEX/VIC/JOE/TET-channel, compared to the signal of the Internal Control in the negative sample. This is due to competition between both amplification systems (Enterovirus specific vs. Internal Control). The amplification signal of the Internal Control in the negative sample shows that the missing signal in the Enterovirus specific FAM-channel is not due to RT-PCR inhibition, but the sample is a true negative.

9. Troubleshooting

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a *real time* RT-PCR.

No fluorescence signal of the Positive Control in the FAM-channel

• The selected channel for analysis does not comply with the protocol
Select the FAM-channel for analysis of the Enterovirus-specific amplification and the HEX/ VIC/ JOE/ TET- channel for the amplification of the Internal Control.

• Incorrect configuration of the RT-PCR
Check your work steps and compare with „procedure“ on pages 5.

• The programming of the thermal profile is incorrect
Compare the thermal profile with the protocol on page 5.

• Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired
Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in „ Storage and Handling “, page 3.

Weak or no signal of the Internal Control and simultaneous absence of a signal in the Enterovirus-specific FAM-channel

• RT-PCR conditions do not comply with the protocol
Check the RT-PCR conditions (page 5).

• RT-PCR inhibited
Make sure that you use an appropriate isolation method (see „sample Preparation“, page 4) and follow the manufacturer‘s instructions.
Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the RNA.

• Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired
Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary use a new kit and make sure kit components are stored as described in „ Storage and Handling “, page 3.

Detection of a fluorescence signal in the FAM-channel of the negative control

• Contamination during preparation of the RT-PCR
Repeat the RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition with the old kit components, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes.
Make sure to pipette the Positive Control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample.
If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the RT-PCR.